

**DER GEHALT AN GLYKOSPHINGOLIPIDEN
VON LOW – DENSITY – LIPOPROTEINEN
BEI NORMALPERSONEN UND BEI PATIENTEN
MIT FAMILIÄRER HYPERCHOLESTERINÄMIE**

Bernhard Sailer

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548319_0060

Aus der Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. N. Zöllner

DER GEHALT AN GLYKOSPHINGOLIPIDEN
VON LOW - DENSITY - LIPOPROTEINEN
BEI NORMALPERSONEN UND BEI PATIENTEN
MIT FAMILIÄRER HYPERCHOLESTERINÄMIE

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig - Maximilians- Universität zu München

vorgelegt von

Bernhard Sailer

aus

Günzburg/Donau

1980

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. Barth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. N. Zöllner

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 31. 1. 1980



1. Einleitung

2. Die ersten Jahre

3. Die Kindheit

4. Die Jugend

5. Die Ehe

6. Die Kinder

7. Die Eltern

8. Die Freunde

9. Die Reisen

10. Die Kunst

11. Die Wissenschaft

12. Die Religion

13. Die Zukunft

Meiner Frau

INHALTSVERZICHT

I. EINLEITUNG	Seite
1.) Die Familiäre Hypercholesterinämie	1
2.) Die Glykosphingolipide: Struktur und bio- logische Funktion.....	5
II. FRAGESTELLUNG	11
III. EXPERIMENTELLER TEIL	
<u>A.) Methoden</u>	
1.) Lösungsmittel und Reagenzien	15
2.) Patienten und Kontrollpersonen	16
3.) Lipoprotein - Präparation	17
4.) Lipidextraktion	19
5.) Milde Alkalische Hydrolyse	19
6.) Dünnschichtchromatographie	21
7.) Darstellung und Elution der Banden	21
8.) Gaschromatographie	23
9.) Sweeley - Säule	26
10.) Folch - Verteilung	26
11.) Photometrische Bestimmungen	27
<u>B. Ergebnisse</u>	31
IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	
A.) Gesicherte Ergebnisse über Veränderungen der LDL bei Familiärer Hyperchole- sterinämie	40
B.) Vergleich der Ergebnisse mit anderen Arbei- ten und Methodenvergleich	42

C.) Physiko - chemische Konsequenzen.....	43
D.) Biologische Schlußfolgerungen	45
V .Abkürzungen	53
VI. Zusammenfassung	54
VII. Literaturverzeichnis	55
VIII. Lebenslauf	64
IX. Zusammenfassung	65

I. EINLEITUNG

=====

1.) Die Familiäre Hypercholesterinämie

Die Stoffwechselkrankheiten mit erhöhten Plasmalipoproteinkonzentrationen werden nach den Kriterien von Fredrickson entsprechend dem Verteilungsmuster der Lipoproteine bei der Elektrophorese eingeteilt (18). Dabei werden die Hyperlipoproteinämien in fünf Typen unterteilt, wobei pathogenetische Mechanismen nicht berücksichtigt wurden, sondern nur der Phänotyp dieser Stoffwechselstörung zur Klassifikation herangezogen wurde. Fredrickson benannte die Familiäre Hypercholesterinämie als Hyperlipoproteinämie Typ II und definierte sie als " vererbba- ren Anstieg der Plasmakonzentration der Low - Density - Lipoproteine (= LDL) " (18). Es handelt sich um eine autosomal dominant vererbte Krankheit, bei der die zwei Phänotypen nach folgenden Kriterien differenziert werden können :

a.) Heterozygoter: 1.) Typ II - Hyperlipoproteinämiemuster

2.) a.) Patient mit Typ II-Muster in
Verwandtschaft ersten Grades

o d e r

b.) tendinöse Xanthome

b.) Homozygoter:

- 1.) Typ II- Lipoproteinmuster mit 2-fach erhöhter LDL- Konzentration im Vergleich zu heterozygotem Patienten in seiner Verwandtschaft
- 2.) Typ II- Lipoproteinmuster bei beiden Eltern.

Die Laborbefunde ergeben bei der Familiären Hypercholesterinämie außer den charakteristischen Elektrophoreseverteilungen der Lipoproteine eine stark erhöhte Cholesterinkonzentration, bedingt durch die Vermehrung der β - Lipoproteine im Serum. Die Triglyceride sind bei Typ II a normal und bei Typ II b geringgradig vermehrt, wobei die Erhöhung der Triglyceridkonzentration bei Typ II b durch eine Vermehrung der Very - Low - Density - Lipoproteine (=VLDL) bedingt ist. Der Cholesterin/Triglycerid - Quotient liegt immer über 1,5 bei der Familiären Hypercholesterinämie (48). Das Serum ist nach 24 -ständigem Stehen bei 4° C bei Typ IIa klar, und bei Typ II b durch die Anwesenheit der Triglyceride in höherer Konzentration leicht getrübt. Entscheidend für die Diagnose der Familiären Hypercholesterinämie ist nicht der generelle Anstieg des Gesamtplasmacholesterins, sondern der Anstieg des β - Cholesterins, das heißt des an die LDL gebundenen Cholesterins.

Die klinischen Charakteristika der Familiären Hypercholesterinämie sind Sehnenxanthome, vor allem im Bereich der Strecksehnen beider Hände und in der Achillessehne. Neben diesen tendinösen Xanthomen finden sich auch tuberöse Xanthome am Ellenbogen, an den Händen und über den Kniegelenken; ebenso können plane Xanthome im Nackenbereich auftreten.

Entscheidend für das Leben der Patienten ist der Grad der vaskulären Komplikationen. Bei homozygoten Patienten setzen bereits in frühester Kindheit eine Atheromatose der Aorta und eine Sklerosierung der Koronararterien ein, deren Ausmaß und Progredienz mit der Höhe der Plasmacholesterinkonzentration korreliert (48). Deshalb setzen auch die pectanginösen Beschwerden bei homozygoten Patienten wesentlich früher ein als bei heterozygoten Patienten. Bereits im Kindesalter können Patienten mit homozygoter Familiärer Hypercholesterinämie an Herzinfarkt sterben, sie überleben fast nie das dritte Lebensjahrzehnt.

Die Häufigkeit dieser Erkrankung beträgt nach Fredrickson 20 - 30 % aller Hyperlipoproteinämien (18) .

Da die Familiäre Hypercholesterinämie bereits in frühester Kindheit mit erhöhten Cholesterinwerten einhergehen kann, wurde bereits versucht, eine Screening Methode zu entwickeln, indem bei Neugeborenen die Cho-

lesterinwerte im Nabelschnur- Venenblut bestimmt wurden (31, 25). Neuere groß angelegte Studien lassen aber erkennen, daß diese Methode nicht in der Lage ist, zuverlässig Kinder mit Familiärer Hypercholesterinämie herauszufiltern, da Cholesterin und Triglyceridwerte anscheinend von perinatalen Faktoren beeinflusst werden (20).

In den letzten Jahren wurden die Schwerpunkte in der Erforschung der Pathogenese der Familiären Hypercholesterinämie auf Unterschiede an den Hautfibroblasten verlegt, und diagnostische Methoden auf diesen Befunden zu entwickeln versucht. Andererseits wurden auch Arbeiten über Unterschiede der LDL bei Normalpersonen und bei Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie veröffentlicht. Anscheinend sind bei dieser Krankheit Unterschiede an beiden Untersuchungsobjekten von Bedeutung.

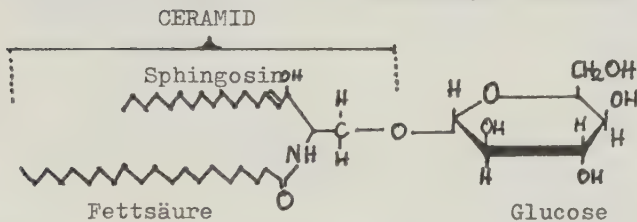
2.) Die Glykosphingolipide - Struktur und biologische Funktion

a.) Struktur und Vorkommen

Die Glykosphingolipide stellen eine große Gruppe heterogener Lipidsubstanzen dar, die neben der Sphingosin - Fettsäure - Einheit (= Ceramid) eine oder mehrere Kohlehydratkomponenten enthalten (40).

1.) Ceramidmonohexoside: Cer - Glc und Cer - Gal

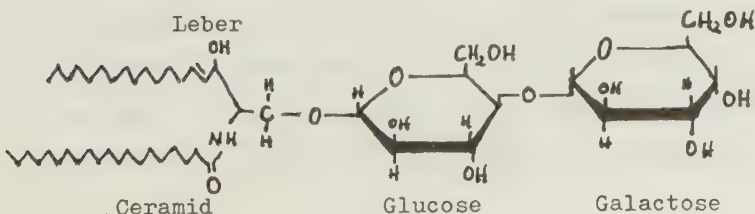
a.) Glycosylceramid: Vorkommen in Leber, Milz
 Erythrozyten und im Serum
 (10).



b.) Galactosylceramid: Als "Cerebrosid" zuerst dem Gehirn isoliert, v.a. im Nervengewebe vorhanden.

2.) Ceramiddihexosid: Cer - Glc - Gal

Vorkommen v.a. im Serum Erythrozyten und



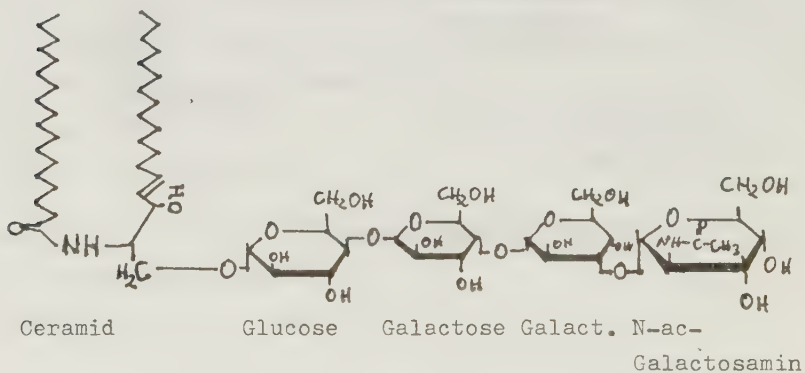
3.) Ceramidtrihexosid: Cer - Glc - Gal - Gal

Dieses Glykosphingolipid kumuliert bei Patienten mit M. Fabry. Am meisten vorhanden in den Nieren, im Serum und in kleiner Konzentration im Erythrozyten (10).

4.) Ceramidtetrahexosid (Globosid) :



Globosid ist der Hauptbestandteil der Glykosphingolipide der menschlichen Erythrozyten und beträgt ca. 5 - 10 % des Gesamtlipides der roten Blutkörperchen; außerdem in Milz, Leber , Niere.



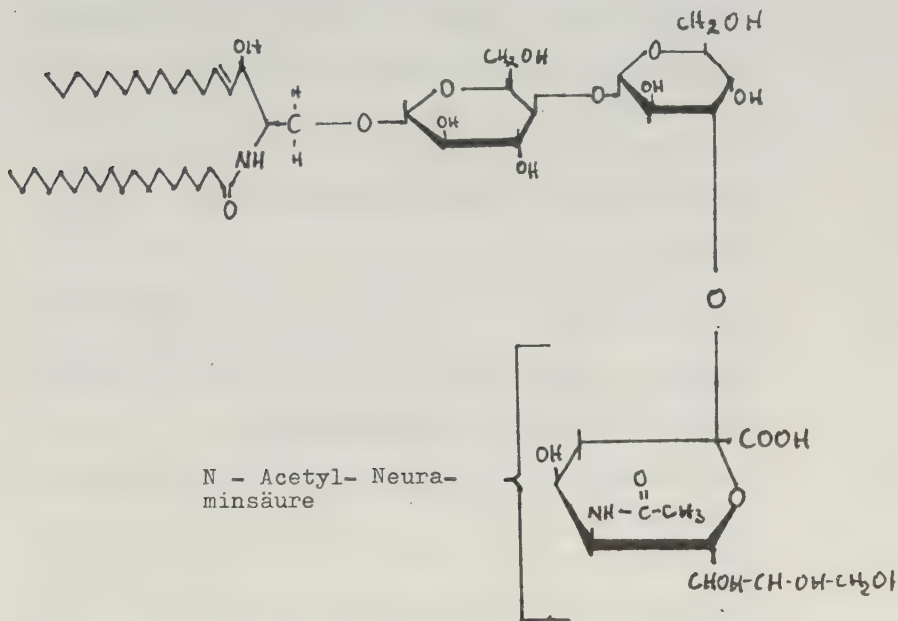
5.) Ganglioside:

Sie wurden zuerst in der grauen Gehirns substanz isoliert, wo sie hauptsächlich gefunden werden . Charakteristisch für die Ganglioside ist, daß zu den Ceramid-, Hexosen-, und N-Acetyl-Hexosaminbau-

steinen noch zusätzlich N- Acetyl- Neuraminäure ange-
koppelt ist.

a.) Hämatosid: Cer - Glc - Gal - N-ac-Neuramin-
säure

Hämatosid entspricht dem Gangliosid GM₃
und ist das am meisten im Plasma vorkommen-
de Gangliosid (45).



b.) Metabolismus und biologische Bedeutung der Glyko-sphingolipide

Die Synthese der Glykosphingolipide wurde geklärt durch die Arbeiten von Basu, Kaufman und Roseman, die nachweisen konnten, daß an das Ceramidgrundgerüst mit Hilfe von spezifischen Glycosyltransferasen, die im Golgi-Apparat der Zellen vorkommen (30), " aktivierte " Hexosen (UDP-Galactose oder UDP-Glucose) successive angehängt werden, wobei der Zuckeranteil als Monosaccharideinheit von dem Zucker-Nucleosiddiphosphatkomplex auf die Kohlenhydratkette übertragen wird (6).

Der Abbau der Glykolipide verläuft unter stufenweiser Abspaltung der Hexosen durch Glycosylhydrolasen. Diese Enzyme sind in allen Organen vorhanden und sind in den Lysosomen lokalisiert. Entsprechend der intrazellulären Verteilung der Enzyme werden bei einem Enzymdefekt in den betroffenen Zellen die Lipide nicht vollständig abgebaut, und es kommt zu Lipoidspeicherkrankheiten, wie z.B. Nieman-Pick (Anhäufung von Sphingomyelin), Morbus Gaucher (Glycosylceramidspeicherung), Morbus Krabbe (Galactosylceramidspeicherung), Morbus Fabry (Ceramid-trihexoside gespeichert). Klinisch stehen bei diesen Speicherkrankheiten entweder viscerale Symptome

(Hepatosplenomegalie bei Ablagerung der Lipide im RES) oder neurale Beschwerden im Vordergrund.

Die große Bedeutung der Glykosphingolipide ergibt sich aus ihrem Vorkommen in Membranstrukturen, da sie sowohl der Hauptbestandteil der Plasmamembranlipide der Säugetierzellen sind (44), als auch auf der Oberflächenmembran vieler Zellen lokalisiert sind, so z.B. auf den Erythrozyten. Daher ist auch ihre Bedeutung bei Immunreaktionen verschiedener Art zu erklären. Yamakawa (1965) isolierte die ersten blutgruppenaktiven Glykosphingolipide vom Globosidtyp, Hakomori und Strycharz (1968) klärten die Struktur der zellulären A,B, und O-Antigene und der Lewis a und b-Haptene auf, welche die bekanntesten Blutgruppenantigene von ca. 65 Blutgruppensubstanzen mit Glykosphingolipidstruktur darstellen (44,43).

Die neueren Forschungen über die biologische Wertigkeit der Glykosphingolipide befassen sich hauptsächlich mit der Immunochemie maligner Zellmembranen und deren Unterschied im Glykosphingolipidmuster zu Membranen normaler Zellen. Außerdem wird untersucht, inwieweit die Kontaktinhibition von malignen Zellen unter dem Einfluß einer intakten Glykosphingolipidoberflächenstruktur steht, d.h. welche Beziehung besteht zwischen Tumorgenese und Glykosphingolipidmuster auf der Oberflächenmembran der Zellen (38,

26). Rapport (1969) und Roseman (1970) hatten bereits erkannt, daß die Glykolipide der Zelloberfläche bei der interzellulären Interaktion die Funktion der zellulären Erkennung und Haftung erfüllen, wobei dies vor allem für die Ganglioside zutrifft (30). Veränderungen der Glykolipidmuster wurden bei vielen Arten von transformierten Zellen gefunden (30, 26, 7, 19), unabhängig von den transformierenden Agentien. Das Charakteristische ist dabei eine Simplifizierung der Glykosphingolipidmuster, vor allem eine Verkürzung der Ganglioside (26), die durch einen Syntheseblock entsteht und eine Verkürzung der Hexosenkette bewirkt. Aus der veränderten Zelloberfläche resultiert ein verändertes soziales Verhalten der Zellen in Zellverbänden; so verlieren transformierte Zellen ihre Fähigkeit zur Kontaktinhibition, während normale Zellen durch zelluläre Interaktion die Wachstumsrate der Zellverbände regulieren können.

Da die Glykosphingolipide eine solch bedeutende Rolle bei der Kontaktaufnahme von Zellen untereinander spielen, könnten sie auch theoretisch die Kontaktaufnahme von Molekülen und Zellen z.B. durch spezifische Rezeptoren beeinflussen. Deshalb ist es von Interesse, die Glykosphingolipide der LDL bei Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie auf eine Veränderung bezüglich ihrer Konzentration pro LDL-Molekül zu untersuchen.

II. FRAGESTELLUNG

=====

In den beiden letzten Jahrzehnten war die Frage nach einer biochemischen Veränderung des LDL- Moleküls Gegenstand vieler Untersuchungen, da bei der Familiären Hypercholesterinämie die LDL- Fraktion erhöht ist, und die LDL bei der Entstehung der Atheromatose eine bedeutende Rolle spielen (8). Dabei wurde die Pathogenese der Atherome mit einer erhöhten Einlagerung von LDL mit Anreicherung von Cholesterin und Lipiden in der Gefäßintima erklärt, da im Anfangstadium der Atheromatose die β -Lipoproteine mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachgewiesen werden konnten (28). Ob die Erhöhung der LDL- Konzentration im Serum von Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie mit einer veränderten biochemischen Zusammensetzung des LDL- Moleküls zusammenhängt, wurde von verschiedenen Autoren untersucht. Dabei wurden veränderte physikalische Eigenschaften und biochemische Strukturunterschiede im Vergleich zu Normalpersonen bei Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie festgestellt (23, 4, 42, 35). Die Veränderungen scheinen hauptsächlich im Lipidanteil des LDL- Moleküls lokalisiert zu sein, da bei dem Apoproteinanteil bezüglich der Aminosäurezusammensetzung keine Unterschiede entdeckt wurden.

Die Rolle der Glykosphingolipide bei der Atherogenese wurde erstmals von Coles untersucht, und er stellte eine Veränderung der Konzentration der vier neutralen Glykosphingolipide an der Aortenoberfläche fest (14).

Bagnall et al. fanden, daß bei den LDL von Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie der Gehalt an Cholesterinester pro Molekül LDL erhöht ist (4), und durch Messung der Dielektrizitätskonstante fanden Grant et al. (23) eine im Vergleich zu LDL von Normalpersonen 5-fach erhöhte Hydratation bei homozygoten Patienten, während der Wert der LDL-Hydratation bei heterozygoten Patienten in der Mitte zwischen Normalwert und dem Wert der homozygoten Patienten lag.

Auran und Mitarbeiter (3) konnten eine Erhöhung der vier neutralen Glykosphingolipide im Serum von Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie um 37 - 100 % nachweisen und ebenso einen Anstieg von Hämatosid um 17%. Dawson konnte diese Ergebnisse bestärken, indem er eine 4-5-fache Erhöhung der Serumglykosphingolipide bei homozygoten Patienten nachwies (15). Dawson kam allerdings zu dem Ergebnis, daß diese Erhöhung der Glykosphingolipide gut mit der Erhöhung des Serumcholesterins und der erhöhten LDL-Konzentration korrelierte, und er verneinte eine spezifische biochemische Strukturveränderung des LDL-Moleküls bezüglich der Glykosphingolipide .

Während unserer Untersuchungen bezüglich der Unterschiede des LDL-Moleküls bei Normalpersonen und bei Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie veröffentlichten Chatterjee und Kwiterovich eine Arbeit gleicher Thematik bei einem einzigen Patienten mit homozygoter Anlage. Dabei stellten sie bei dem Patienten eine 2 - 18-fach erhöhte Konzentration der Serumglykosphingolipide fest, wobei ebenfalls die vier neutralen Glykosphingolipide und Hämotosid untersucht wurden. Chatterjee und Kwiterovich kamen zu dem Ergebnis, daß diese Erhöhung hauptsächlich auf einem absoluten Anstieg der Glykosphingolipide/ Molekül LDL basiert (11). Außerdem kamen sie auch zu dem Schluß, daß die meisten, wenn nicht sogar alle Glykosphingolipide im Serum mit den Lipoproteinen verknüpft sind, wobei die funktionelle Rolle der Glykosphingolipide im oder auf der Oberfläche des LDL- Moleküls noch nicht geklärt ist.

Für unsere Arbeit erhob sich nun die Frage, ob das Ergebnis von den beiden oben genannten Autoren generell für das LDL- Molekül gilt, oder ob bei dem von ihnen untersuchten Patienten eine Variante der Krankheit bzw. des LDL- Moleküls vorlag. Außerdem liegen keine Werte über die graduellen Unterschiede des Glykosphingolipidgehaltes der LDL zwischen heterozygoten und homozygoten Patienten vor. Weiterhin sollte

untersucht werden, ob eine zu beweisende Erhöhung der Glykosphingolipide eventuell einen Bezug zu der nachgewiesenen Erhöhung der Hydratation des LDL-Moleküls bei Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie ergäbe.

III. EXPERIMENTELLER TEIL

=====

1.) Lösungsmittel und Reagenzien:

Alle Lösungsmittel und Reagenzien waren vom Reinheitsgrad p. A. und wurden von der Firma Merck, Darmstadt, geliefert. Die Firma Serva, Heidelberg, lieferte das MSTFA (N-Trimethyl-silyl-N-methyltrifluoracetamid).

Testsubstanzen :

Glucosylceramid aus Rindermilz und Globosid aus menschlichen Erythrozyten wurden freundlicherweise von Dr. G.Tschöpe, Institut für Physiologische Chemie der Universität Köln zur Verfügung gestellt.

Von der Firma Serva, Heidelberg, wurden folgende Testsubstanzen bezogen:

Galactosylceramid, Kephalin, Lecithin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinosit, Sphingomyelin, Sphingosin, Ceramid, N-acetyl-neuraminsäure, N-acetyl-glucosamin, N-acetyl-galactosamin.

Ceramiddihexosid und Ceramidtrihexosid wurden nach Standardmethoden aus menschlichen Erythrozyten und aus Schweineleber präpariert.

2.) Patienten und Kontrollpersonen

Auswahlkriterien:

- 1.) LDL-Cholesterin $>$ 95 Perzentile, alterskorrigiert
- 2.) Sekundäre Hyperlipidämie ausgeschlossen
- 3.) Fibroblastenverhalten der homozygoten Patienten gemäß den Kriterien von Goldstein und Brown
- 4.) Patienten über 40 Jahren wurden nur herangezogen, wenn die Familiäre Hypercholesterinämie durch Familienanamnese, Eigenanamnese und zusätzlich durch Sehnenxanthome gesichert war.

a.) Kontrollpersonen:

Bei allen Kontrollpersonen war keine Stoffwechselstörung bekannt.

I: ♂ 29 Jahre	II: ♀ 29 J.	III: ♀ 30 J.
IV: ♂ 24 J.	V: ♂ 38 J.	VI: ♂ 21 J.

b.) Heterozygote Patienten:

- VII : ♀ 34 J. - keine Xanthome, Gesamtcholesterin: 320 mg%
- VIII : ♀ 29 J. - Xanthome am Gesäß, Angina pectoris,
Gesamtcholesterin: 325 mg%
- IX : ♂ 52 J. - Sehnenxanthome, Gesamtcholesterin:
360 mg%
- X : ♀ 37 J. - pectanginöse Beschwerden, Gesamtcholesterin: 370 mg%

XI : ♂ 36 Jahre - obliterierende Angiopathie, Zustand nach Infarkt, Gesamtcholesterin: 350 mg%

XII : ♂ 36 J. - Angina pectoris, Gesamtcholesterin: 350 mg%

c) Homozygote Patienten:

XIII : ♂ 13 - beide Eltern heterozygot, ausgeprägte Sehnenxanthome

XIV : ♀ 14 - beide Eltern heterozygot, ausgeprägte Sehnenxanthome

XV : ♂ 21 - ausgeprägte Sehnenxanthome, Gesamtcholesterin: 600 - 1000 mg%, schwerste pectanginöse Beschwerden.

3.) Lipoprotein - Präparation

Die Lipoproteinpräparation erfolgte nach dem Prinzip der sequentiellen Flotation (27), wobei die einzelnen Lipoproteinklassen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte beim Zentrifugieren in Lösungen mit verschiedenen Dichtestufen entsprechend ihrer Dichteklasse nach oben flotieren.

Die Dichteklassen der Lipoproteine sind:

very-low-density-lipoproteins (VLDL) $< 1,006$ g/ml

low-density-lipoproteins (LDL) $1,019 - 1,063$ g/ml

high-density-lipoproteins (HDL) $1,063 - 1,221$ g/ml

Das Blut wurde von gesunden Kontrollpersonen und von Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie nach 16-stündigem Fasten entnommen, mit EDTA versetzt und sofort bei 1000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Nur bei dem homozygoten Patienten XV erhielten wir von Dr. Thompson, Hammersmith Hospital, London, bereits Plasmaphoreseplasma. Das Plasma wurde abpipettiert, 3/11 Volumen H_2O aufgefüllt und in einer Beckman - L 5 - Ultrazentrifuge bei $10^{\circ}C$ 20 Stunden bei 40 000 U/min zentrifugiert. Die nun überstehende Bande der VLDL wurde mit einer Pasteurpipette abgehebert. Die Dichte wurde nun durch Zugabe von Kaliumbromidsalz (37) auf $1,019$ g/ml erhöht, die Dichte mit einem Pyknometer geprüft und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die oberste Schicht wurde abgehebert und die Dichte auf $1,063$ g/ml erhöht. Nachdem wiederum unter gleichen Bedingungen zentrifugiert worden war, wurde die obenschwimmende orangegelbe LDL-Schicht mit der Pasteurpipette abgezogen und in 25 ml KBr - Lösung mit einer Dichte von $1,063$ g/ml erneut zentrifugiert. Nach dieser Rezentrifugation wurde zum Unterstand KBr bis zur Dichte von $1,221$ g/ml gegeben

und so die HDL isoliert. Die VLDL, HDL und die rezentri-
fugierten LDL wurden jeweils fünfmal gegen 0,9%-ige
NaCl-Lösung bei 4°C im Visking Dialyseschlauch der Fa.
Serva, Heidelberg, dialysiert, und durch einen Milli-
pore-Filter steril filtriert; für die Proteinbestimmung,
die Cholesterinbestimmung und für die Phospholipidbe-
stimmung wurden aliquote Teile entnommen. Die Proben
wurden bei 4°C aufbewahrt.

4.) Lipidextraktion :

Zu den Lipoproteinproben wurde etwa das 50-fache Volu-
men Chloroform/Methanol - 2/1 zugegeben, und die
Lipide wurden extrahiert, indem die Proben 4 Stunden
in einen Schüttler bei Raumtemperatur gestellt wurden.
Die Extraktion wurde mit Chloroform/Methanol-1/2 zwei-
mal wiederholt, da sich die polaren Lipide besser in
diesem Lösungsmittel lösen. Die vereinigten Extrakte
wurden im Rotationsverdampfer im Vakuum getrocknet,
nachdem aliquote Teile zur Messung von Phosphat und
Cholesterin entnommen waren.

5.) Milde Alkalische Hydrolyse:

Die Trennung der sonst bei der Dünnschichtchromato-

graphie störenden Glycerophospholipide von den zu untersuchenden Glykosphingolipiden erfolgte durch die Milde Alkalische Hydrolyse, wobei die Esterbindungen der Phospholipide gespalten werden, während die glykosidischen Bindungen der Glykosphingolipide intakt bleiben. Entsprechend dem Verfahren von Vance und Sweeley (49) wurden zu der Trockne mit den Gesamtlipiden 1 ml Chloroform und 1 ml 0,6 n methanolische KOH zugegeben, die Probe geschüttelt und 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nachdem die Glycerinesterbindungen der Phospholipide in dieser Zeit hydrolysiert waren, wurde mit 1,2 ml 0,5 n methanolischer Salzsäure unter Wasserkühlung neutralisiert. Das dabei ausgefällte Salz wurde abzentrifugiert. Während in der Originalmethode nach Vance und Sweeley der Überstand noch einmal mit Chloroform/Wasser - 3,4/1,2 ml gewaschen und zweimal mit Methanol/Wasser - 1/1 nachgewaschen wird, wurde hier darauf verzichtet. Denn der Vorteil dieses abgekürzten Verfahrens liegt darin, daß die Möglichkeit des Verlustes von polaren Glykosphingolipiden (v.a. Hämatosid) in der "theoretischen Oberphase ", wie in der Originalmethode, ausgeschlossen wird. Der Überstand wurde abpipettiert, im Vakuum getrocknet und dann mit einer kleinen Menge Chloroform/Methanol/Wasser - 100/42/6 für die Analyse mit der Dünnschichtchromatographie gelöst.

6.) Dünnschichtchromatographie:

Die Platten waren 20 x 20 cm groß und mit Kieselgel H nach Stahl beschichtet; sie wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, geliefert. Die Kammer enthielt einen Streifen Papier, um eine gleichmäßige Sättigung der Luft zu gewährleisten. Die Laufmittel wurden jeweils 2 Stunden vor der Trennung frisch hergestellt, folgende Lösungsmittel wurden verwendet:

Chloroform/Methanol/Wasser - 100/42/6 für die Darstellung der Gesamtlipide

Chloroform/Methanol/25%-iger Ammoniak - 60/35/8 zur Darstellung der Globoside. Der R_f -Wert von Globosid wurde durch die Zugabe von 25%-igem Ammoniak erniedrigt, da Globosid etwas basisch reagiert und dann auf dem Chromatogramm als unterste Bande erscheint.

Die verschiedenen Proben von Patienten, Kontrollpersonen und Testsubstanzen wurden zugleich auf die Platten aufgetragen.

7.) Darstellung der einzelnen Banden und Elution

Die einzelnen Banden der verschiedenen Glykosphingolipide wurden in der Jodkammer sichtbar gemacht und markiert. Nachdem das Jod abgedampft war, wurden die markierten Bereiche mit einem Skalpell vom Glas gelöst,

und sorgfältig mit einer Pipette, deren Ende abgedichtet war, mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe, abgesaugt. Um die Glykosphingolipide zu lösen, wurde zu den Kieselgelstückchen 5 ml Chloroform/Methanol/Wasser - 60/40/10 gegeben. Das Eluat wurde bis zum Bodensatz (=Kieselgel) abpipettiert und das Lösungsmittel unter N_2 abgeblasen.

Dünnschichtplatten, die zur qualitativen Unterscheidung der einzelnen Banden dienten, wurden mit drei verschiedenen Anfärbemethoden behandelt:

- 1.) Veraschung durch Ansprühen mit 50%-iger Schwefelsäure, wobei die Glykosphingolipidbanden vorübergehend eine Rotfärbung annahmen.
- 2.) Besprühen mit Orcin- Schwefelsäure Spray und anschließend mit $FeCl_3$ in 10%-iger Schwefelsäure. Die Dünnschichtplatte mit einer Glasplatte abdecken und 5 Minuten bei $110^{\circ}C$ erhitzen.
(Glykolipide - violett, Gangliosid - blau)
- 3.) Besprühen mit einer 0,5 %-igen Lösung von α -Naphthol in Methanol/Wasser - 1/1, dann mit 95%-iger Schwefelsäure besprühen und 5 Minuten bei $110^{\circ}C$ erhitzen. Dabei färben sich die Glykosphingolipide dunkelviolett, Cholesterin grau-rot, während die übrigen Lipide gelb werden.

Eine Orientierung über das Laufverhalten der Lipide während der Chromatographierung liefert das UV-Licht.

Dabei wurde die Platte unter UV- Licht von 350 nm Wellenlänge gehalten, und die einzelnen Banden erscheinen als weiße Streifen. Die Möglichkeit der Rechromatographierung bleibt hierbei erhalten, im Gegensatz zur Sichtbarmachung mit Joddampf.

Die Stärke der Anfärbung unter Joddampf entspricht nicht exakt der Quantität der anwesenden Glykosphingolipide, da frontnähere und frontfernere Bezirke unterschiedlich gefärbt werden, und auch die Verweildauer in der Jodkammer die Farbinintensität beeinflusst.

8.) Gaschromatographie:

Die qualitativen und quantitativen Analysen Der Glykosphingolipide wurden mit einem "varian 2700 aerograph" Gaschromatographen gemacht, ausgestattet mit einem Flammenionisationsdetektor. Die Glassäule war 180 cm lang und mit 3% SE 30 (Fa. Serva, Heidelberg) auf Gaschrom Q (Fa. Serva, Heidelberg) gefüllt. Die Temperatur wurde programmiert von 160 °C auf 240 °C, mit einem Anstieg von 1°C/min. Die Durchlaufgeschwindigkeit von Stickstoff als Trägergas war 30 ml/min.

Die einzelnen Glykosphingolipidbanden wurden wie beschrieben auf dem Dünnschichtchromatogramm identifiziert, eluiert und das Lösungsmittel unter N₂ ab-

blasen.

Die Methanolyse der Glykosphingolipide, bei der die Glykosphingolipide in ihre einzelnen Komponenten (Ceramid und Methylglykoside der einzelnen Zucker) aufgetrennt werden, erfolgte mit 1%-iger methanolischer Salzsäure. Die Proben wurden im Glycerinbad bei 80 °C 18 Stunden hydrolysiert, danach abgekühlt und dann mit methanolischer NaOH auf pH 7 neutralisiert. Bei einem Teil der Proben mit Globosid und Hämatosid wurden die bei der Methanolyse abgespaltenen Acetylgruppen reacetyliert (17), indem zu den Proben 0,2 ml Pyridin und 0,2 ml Acetanhydrid zugegeben wurde. Nach der Neutralisation der Proben wurde das NaCl-Salz abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgehebert, und zur vollständigen Reinigung in einer Mischionenaustauscher-Säule (Fa. Serva, Heidelberg), dreimal mit Methanol eluiert. Die Eluate wurden im Vakuum getrocknet und als innerer Standard eine Mannitlösung (49) zugegeben; die Lösung wurde jeweils frisch hergestellt. Zu den Proben wurde schließlich MSTFA zugefügt und die Proben wurden im Wasserbad bei 60°C 2 Minuten erwärmt und schließlich jeweils 5 µl in den Gaschromatographen eingespritzt.

Die Qualifikation der einzelnen peaks wurde durchgeführt, indem jeweils vor dem Einspritzen der Proben Standard-TMSi- Derivate der Methylglykoside,

die untersucht werden sollten, chromatographisch aufgezeichnet wurden. Die Retentionszeiten der peaks der Standardsubstanzen entsprachen den Retentionszeiten der gleichen Substanzen bei anderen Autoren (49). Die peaks der zu bestimmenden Proben wurden dann anhand der Standardchromatogramme qualifiziert.

Die Quantifikation der Glykosphingolipide wurde dadurch erreicht, daß jeweils bei den Proben der Glucosepeak (bei allen untersuchten Glykosphingolipiden jeweils nur ein Molekül Glucose/ Molekül Glykosphingolipid) planimetrisch gemessen wurde und mit dem ebenfalls gemessenen Mannitpeak (bekannte Menge) verglichen wurde. Schließlich wurde in nmol/Glykosphingolipid/mg LDL-Apoprotein umgerechnet.

Ein Teil des Hämatosides wurde photometrisch bestimmt, indem nach der Dünnschichtchromatographie die N-acetyl-neuraminsäure gemessen wurde .

Ausbeutemessung im Vergleich zu Vance und Sweeley (49)

Um unsere Methode mit der Originalmethode zu vergleichen, wurden in einigen Kontrollexperimenten jeweils eine konstante Menge von Glykosphingolipiden nach unserer abgekürzten Methode behandelt und ein aliquoter Teil zusätzlich der Sweeley-Säule und der Folch-Verteilung unterzogen, um eventuelle Substanz-

verluste bei einer der beiden Methoden aufzuzeigen.

9.) Sweeley - Säule (49) :

Kieselsäure " Mallinkrodt " wurde in das sechsfache Volumen Aquadest gegeben, gerührt, jeweils 15 Minuten sedimentiert und dekantiert; der Vorgang wurde 10-mal wiederholt und die Kieselsäure dadurch von feinen Partikeln befreit. Das Sediment wurde mindestens 12 Stunden bei 130 °C im Trockenschrank aktiviert. Die Kieselsäure wurde mit Chloroform aufgeschlämmt und langsam in die Glassäule (30x2,5 cm) geschüttet, wobei ständig mit Chloroform nachgewaschen wurde. Die zur Trockne eingedampfte Testsubstanz Globosid wurde mit Aceton /Methanol - 9/1 gelöst und langsam in die Säule pipettiert. Die einzelnen Läufe wurden jeweils mit dem 7-fachen Säulenvolumen gemacht.

1. Lauf: Aceton / Methanol - 9/1
2. Lauf : Chloroform / Methanol - 9/1
3. Lauf : Methanol / Wasser - 1/1

10.) Folch - Verteilung

Die Testsubstanz Globosid wurde in Chloroform/ / Methanol - 2/1 gelöst, scharf geschüttelt und zu der frisch hergestellten Lösung (3 ml Chloroform/ /Methanol/0,9 % KCl) gegeben und lange geschüttelt.

Die Oberphase ($\text{KCl-H}_2\text{O-Methanol}$) und die Unterphase (Chloroform) wurden getrennt und die Lösungsmittel unter Stickstoff abgeblasen. Die Trocknen wurden dann auf ihren Gehalt an Zucker nach der Anthronmethode photometrisch getestet.

11.) Photometrische Bestimmungen:

1.) Zuckerbestimmung mit Anthron (39)

- I.) 2%-ige Stammlösung von Anthron in konzentrierter Schwefelsäure, jeweils frisch hergestellt.
- II.) Schwefelsäure (konz.)/ Wasser - 25/12
- III.) 0,3 ml Lösung I und 3,7 ml Lösung II

Zu der trockenen Substanzprobe wurden 0,5 ml 85 %-ige Phosphorsäure zugefügt, die Probe wurde geschüttelt, 15 min bei 90°C erwärmt, in Eiswasser abgekühlt; dann wurde 1,5 ml Lösung III zugegeben, geschüttelt, 24 min bei 90°C erwärmt, in Eiswasser abgekühlt und in 1-cm Küvetten bei 620 nm gemessen. Als Standard wurden Lösungen mit 5, 10, 20, 40, 80, und 100 μg Galactose hergestellt.

2.) Neuraminsäurebestimmung nach AMINOFF (1)

- A.) 25 mM Perjodsäure in 0,125 n H_2SO_4

B: 2%-Na-Arsenit in 0,5 n HCl

C: 0,1 m 2-Thiobarbitursäure in Wasser, mit NaOH-Lösung auf pH 9

D: 95 ml n-Butanol + 5 ml HCl konz.

Die trockene Probe wurde mit 0,25 ml 0,125 n H_2SO_4 versetzt, die Hydrolyse dauerte 45 Minuten bei 84 °C, dann wurden die Proben abgekühlt, 0,15 ml Lösung A zugegeben, 30 min bei 37°C erwärmt, abgekühlt, 0,12 ml Lösung B zugegeben und so lange geschüttelt, bis die Lösung farblos wurde. Dann wurde 1 ml Lösung C zugefügt, 7,5 Minuten bei 100 °C erhitzt, wiederum abgekühlt, mit 2,5 ml Lösung D versetzt, geschüttelt, und zentrifugiert. Die obere Phase wurde abpipettiert und in 1 cm Küvetten bei einer Wellenlänge von 549 nm gemessen. Als Standard wurden Lösungen mit 1, 2, 4, 8, 10 µg NANA verwendet.

3.) Proteinbestimmung nach LOWRY (34)

A: 2% Na_2CO_3 in 0,1-n- NaOH

B: 0,5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in 1% K-Na-Tartrat

C: 50 ml A + 1 ml B vor Gebrauch

D: Folin - Reagenz - Wasser (1/1)

Zur trockenen Probe wurde 2 ml Lösung C zugegeben, geschüttelt, 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, anschließend 0,2 ml Lösung D zugefügt, sofort im Schüttler gemischt, 3 min bei 37 °C erwärmt und

bei Raumtemperatur stehen gelassen. Gemessen wurde in 1 cm Glasküvetten bei 478 nm. Als Standard wurden Aliquote einer Lösung von 0,5 mg Rinderserumalbumin verwendet.

4.) Cholesterinbestimmung nach ZLATKIS und ZAK (51)

A : Eisenchloridlösung: 1 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ in 10 ml
Eisessig

B : 1 ml Eisenchloridlösung auf 100 ml mit konzentrierter Schwefelsäure unter Rühren aufgefüllt.

Zur trockenen Probe wurde 1,5 ml Eisessig gegeben, die Probe unter Erwärmen gelöst, 1 ml Lösung B hinzugefügt, geschüttelt, abgekühlt, und bei einer Wellenlänge von 560 nm in 1 cm Küvetten gemessen. Als Standard wurden 100 mg Cholesterin in 100 ml Eisessig gelöst.

5.) Phosphatbestimmung nach BARLETT (5)

A : 5%-ige Lösung von $(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ in Aquabidest

B : Fiske - Subbarrow - Reagenz

0,125 g gereinigte 1-amino-2-naphtol-4-sulfonsäure wurde unter Rühren zu 50 ml frisch bereiteter 15 %-iger NaHSO_3 -Lösung gegeben, dazu 0,25 g

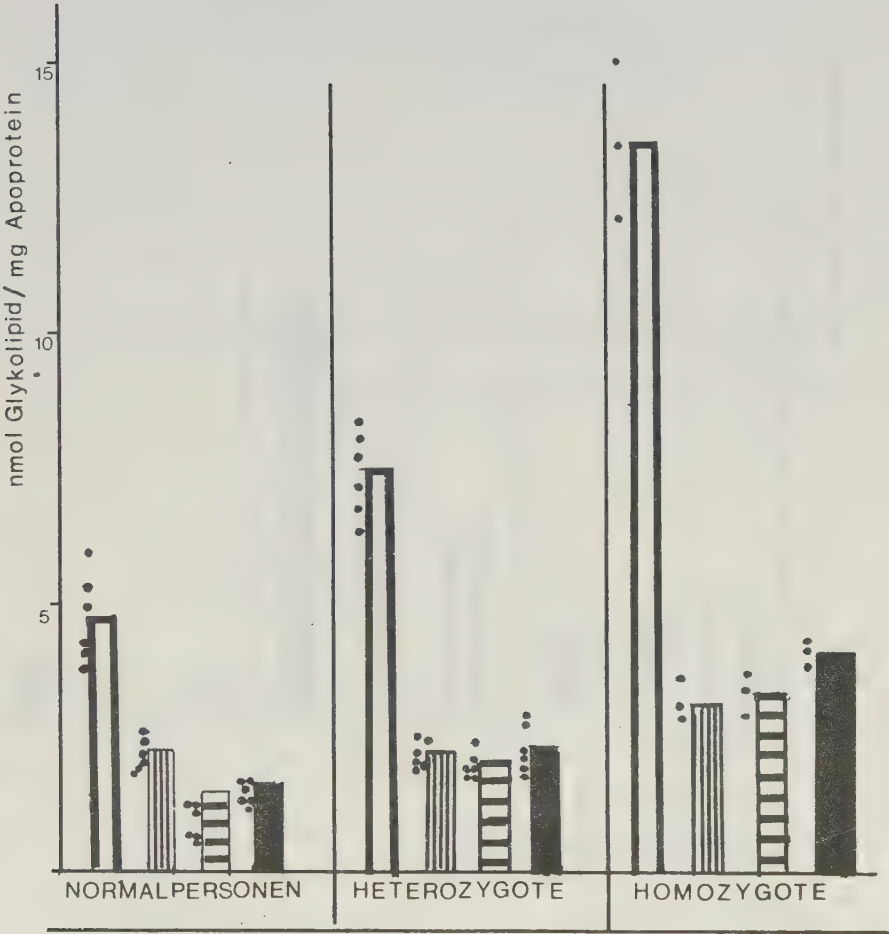
NaSO_3 wasserfrei, filtriert und nicht länger als 1 Woche aufbewahrt.

Alle verwendeten Gefäße wurden mit Chromschwefelsäure und anschließend mit Aquabidest gewaschen.

Zur trockenen Probe wurden 0,6 ml einer 70%-igen HClO_4 zugefügt, über Nacht bei 170°C verascht, nach Abkühlen wurden 4 ml Aquabidest, 0,2 ml Ammoniummolybdatlösung und 0,2 ml Lösung B zugefügt und die mit einer Aluminiumfolie abgedeckten Gläser 10 min bei 100°C erhitzt .

Gemessen wurde in 1 cm Standardküvetten bei einer Wellenlänge von 660 nm. Als Standard wurde eine Lösung mit 2 μMol verwendet (0,272 g NaH_2PO_4 trocken eingewogen, mit Aquabidest auf 1 l aufgefüllt und 10 ml 1-n- H_2SO_4 p.A. zugegeben.

Tabelle I : Darstellung der Glykolipidmengen [nmol] pro
LDL-Apoprotein [mg]



• = Einzelwerte

Mittelwerte der Glykolipide:



= Glu-cer



= Lac-cer



= Trihexosid



= Globosid

Tabelle II : Darstellung des Hämatosidgehaltes der
VLDL, LDL, und HDL
in nmol Hämatosid/mg Apoprotein



• = Einzelwerte

Hämatosid - Mittelwerte :

 = NORMALPERSONEN

 = HETEROZYGOTE

 = HOMOZYGOTE

B . E R G E B N I S S E
=====

Die Glykosphingolipide und das Gesamtcholesterin wurden auf mg Apoprotein des LDL-Moleküls bezogen.

Wie aus Tabelle I ersichtlich ist, sind auch bei der Familiären Hypercholesterinämie Unterschiede im Verhältnis von Cholesterin pro Apoprotein gegenüber Normalpersonen existent:

Tabelle I : Verhältnis von Cholesterin/Apoprotein bei
Normalpersonen und bei Patienten mit FHC
(Mittelwerte)

Normalpersonen:	2,15
Heterozygote :	2,23
Homozygote :	2,32

Die untersuchten vier neutralen Glykosphingolipide (Glucosylceramid, Lactosylceramid, Trihexosid, Globosid) zeigten deutlich unterschiedliche Konzentrationen pro LDL-Molekül zwischen Normalpersonen und Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie (FHC). Es wurden keine Überlappungen festgestellt.

Tabelle II: Neutrale Glykosphingolipide in den LDL
(nmol Glykosphingolipid/ mg Apoprotein)

<u>Nr</u>	<u>Glucosyl- ceramid</u>	<u>Lactosyl- ceramid</u>	<u>Trihexosid</u>	<u>Globosid</u>
I	4,23	2,03	1,58	1,73
II	5,30	1,95	1,74	1,54
III	4,05	2,41	1,23	1,40
IV	4,89	2,64	1,77	1,58
V	3,64	1,88	1,10	1,39
VI	5,94	2,17	1,27	1,60
VII	7,83	2,58	1,95	2,80
VIII	8,94	2,34	2,08	1,94
IX	6,77	2,16	1,78	1,81
X	8,28	2,00	1,90	2,25
XI	6,44	1,94	1,74	3,03
XII	7,21	2,66	2,50	2,29
XIII	13,41	3,44	3,34	4,11
XIV	12,08	2,98	2,82	4,22
XV	15,15	2,70	3,65	3,78

Die römischen Ziffern bezeichnen die Nummern der Pro-

banden: I - VI = Normalpersonen

VII - XII = heterozygote Patienten mit FHC

XIII - XV = homozygote Patienten mit FHC

Tabelle III : Mittelwerte aus Tabelle II

(nmol Glykosphingolipid/ mg Apoprotein)

	<u>N</u>	<u>Glu-cer</u>	<u>Lac-cer</u>	<u>Trihex.</u>	<u>Globosid</u>
Normal- personen	(6)	4,67	2,18	1,45	1,54
Hetero- zygote	(6)	7,58	2,28	1,99	2,36
Homozygote (3)		13,55	3,04	3,27	4,04

N = Anzahl der Probanden; Glu-cer = Glucosylceramid
Lac-cer = Lactosylceramid .

Die Mittelwerte lassen erkennen, daß die neutralen Glykosphingolipide bei Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie mit Ausnahme von Lactosylceramid gegenüber Normalpersonen deutlich erhöht waren.

Die folgende Tabelle IV veranschaulicht die prozentuale Erhöhung der neutralen Glykosphingolipide bei Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie. Auch bei heterozygoten Patienten ist eine deutliche Zunahme der Konzentration der Glykosphingolipiden / Apoprotein zu verzeichnen. Bei Lactosylceramid war sowohl bei den heterozygoten wie bei den homozygoten Patienten keine signifikante Erhöhung zu verzeichnen, wäh-

Tabelle IV : Prozentuale Unterschiede des Gehaltes an
Glykosphingolipiden der LDL bei Normal-
personen und bei Patienten mit FHC
 (Normalpersonen- Mittelwert = 100 %)

	<u>Heterozygote</u>	<u>Homozygote</u>
Glucosylceramid	162 %	290 %
Lactosylceramid	104 %	140 %
Trihexosid	137 %	225 %
Globosid	153 %	262 %
Hämatosid	153 %	241 %

rend bei Glucosylceramid der Unterschied am deutlichsten war mit einer fast 3-fachen Erhöhung bei homozygoten Patienten. Die restlichen Glykosphingolipide waren bei den homozygoten Patienten alle über 2-fach erhöht.

Tabelle V und VI lassen erkennen, daß Hämatosid einerseits am meisten an LDL gebunden vorliegt, und andererseits daß die Erhöhung des Hämatosidgehaltes nur bei den LDL im gleichen Maßstab vorhanden war wie die Zunahme der vier neutralen Glykosphingolipide / / Apoprotein.

Tabelle V: Verteilung des Hämatosids in den Lipoproteinfraktionen (nmol Glykosphingolipid/
/ mg Apoprotein)

<u>Nr</u>	<u>VLDL</u>	<u>LDL</u>	<u>HDL</u>
I	1,636	3,531	0,648
II	2,245	2,940	0,809
III	1,733	3,283	0,433
IV	1,446	3,775	0,735
V	2,033	2,804	0,655
VI	2,996	2,690	0,490
VII	1,596	5,103	0,744
VIII	1,733	4,800	0,685
IX	1,345	4,755	0,670
X	0,997	4,513	0,544
XI	1,550	5,822	0,606
XII	1,490	4,282	0,499
XIII	1,346	7,810	0,818
XIV	1,275	6,795	1,184
XV	1,585	8,303	1,008

Die römischen Ziffern bezeichnen die Nummern der

Probanden: I -VI = Normalpersonen

VII - XII = heterozygote Patienten mit FHC

XIII- XV = homozygote Patienten mit FHC

Tabelle VI: Mittelwerte aus Tabelle V

(nmol Hämotosid/ mg Apoprotein)

	<u>N</u>	<u>VLDL</u>	<u>LDL</u>	<u>HDL</u>
Normal - personen	(6)	2,01	3,17	0,63
Heterozygote (6)		1,45	4,88	0,62
Homozygote (3)		1,41	7,64	1,00

N = Anzahl der Probanden

Messung der Ausbeute:

Die Ausbeute unseres Verfahrens war höher im Vergleich zum Originalverfahren nach Vance und Sweeley (49), da Verluste in der Säulenchromatographie und in der Folch-Verteilung entfielen. Deshalb wurden aliquote Teile einer Glykosphingolipidlösung mit bekannter Konzentration einerseits nach dem Originalverfahren aufbereitet, der andere aliquote Teil direkt gemessen, um etwaige Verluste erkennen zu können.

Vance und Sweeley verwendeten von den drei Fraktionen bei der Säulenchromatographie nur die erste Fraktion, die nach unseren Messungen nur 58,45 % der

eingesetzten Glykosphingolipidmenge enthielt. Die zweite Fraktion enthielt 4,32 % und die dritte Fraktion enthielt 37,22 % der Glykolipidmenge.

Bei der Folch-Verteilung fanden wir einen Verlust von 46 % der eingesetzten Glykosphingolipidmenge in die Oberphase, die im Originalverfahren nicht berücksichtigt wird.

Verteilung der Glykosphingolipide in der Folch- Verteilung in Prozenten der eingesetzten Glykosphingolipidmenge

Oberphase : Mittelwert : 46,34 % der eingesetzten
Menge

Unterphase : Mittelwert: 53,18 % der eingesetzten
Menge

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

A.) Gesicherte Ergebnisse über Veränderungen der LDL bei Familiärer Hypercholesterinämie

Die Frage, ob die LDL bei der Familiären Hypercholesterinämie molekular verändert sind, wurde vielfach bearbeitet, und folgende Befunde können mittlerweile als gesichert angenommen werden:

- 1.) Die Hydratation der LDL ist erhöht, wobei die Hydratation der LDL (g Hydrationswasser/ g Lipoprotein) bei heterozygoten Patienten etwa in der Mitte zwischen den Werten von Normalpersonen und denen von homozygoten Patienten liegt (23).
- 2.) Im elektronenmikroskopischen Bild ist bei den LDL von Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie eine rouleaux - Bildung induzierbar (50).
- 3.) Der Cholesterinestergehalt pro g Lipoprotein ist erhöht (4).
- 4.) Eine Erhöhung der Glykosphingolipide im Plasma von Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie ist durch eine Arbeit belegt (15), eine andere Arbeit berichtet von einer Erhöhung der Glykosphingolipide/ LDL - Molekül bei einem Patienten (homozygot) . (11) .

Bei dieser Arbeit ging es darum, an einigen Patienten,

deren heterozygote oder homozygote familiäre Hypercholesterinämie durch Familienanamnese, durch klinische Symptomatik und durch das Verhalten der Fibroblasten in Zellkulturen entsprechend den Kriterien von Goldstein und Brown gesichert war, nachzuprüfen, ob die von Chatterjee und Kwiterovich an e i n e m Patienten nachgewiesene Erhöhung des Gehaltes von Glykosphingolipiden pro LDL- Molekül für homozygote Patienten typisch ist, und inwieweit auch bei heterozygoten Patienten derartige Veränderungen im LDL- Molekül vorliegen.

Kurz zusammengefaßt die Ergebnisse dieser Arbeit:

- 1.) Der Anteil von Cholesterin im LDL- Molekül ist bei der Familiären Hypercholesterinämie erhöht, das Verhältnis Cholesterin / Apoprotein erhöht.
- 2.) Die untersuchten vier neutralen Glykosphingolipide waren bei heterozygoten und homozygoten Patienten erhöht, wobei diese Erhöhung pro Apoproteinanteil bei homozygoten Patienten deutlich höher gegenüber Normalpersonen war als bei heterozygoten Patienten.
- 3.) Hämatosid war nur in der LDL- Fraktion in gleichem Ausmaß erhöht wie die vier neutralen Glykosphingolipide/ LDL-Apoprotein.
- 4.) Die Ausbeute bei unseren Isolationsverfahren war größer als in dem Originalverfahren (49).

B.) Vergleich der Ergebnisse mit anderen Arbeiten und Methodenvergleich

Die in dieser Arbeit gemessenen Werte waren sowohl bei den Glykosphingolipiden der LDL bei Normalpersonen als auch bei den Patienten mit homozygoter Familiärer Hypercholesterinämie durchweg niedriger als die Werte von Chatterjee und Kwiterovich (11). Ein direkter Vergleich beider Arbeiten ist zum gegebenen Zeitpunkt nicht möglich, da mit verschiedenen Methoden gearbeitet wurde. Eine standardisierte Methode, den Glykosphingogehalt bei den LDL zu bestimmen, existiert noch nicht, und eine solche Methode wäre auch erst nach großen Reihenuntersuchungen von Normalpersonen möglich.

Die wesentliche Erkenntnis aus beiden Arbeiten ist die folgende, daß bei der Familiären Hypercholesterinämie der Gehalt der LDL an Glykosphingolipiden erhöht ist.

Die Kriterien, nach denen die Wertigkeit einer Meßmethode zu beurteilen ist, sind der zeitliche Aufwand, die Reproduzierbarkeit und die Ausbeute. Die in dieser Arbeit angewandte Methode war im Vergleich zu bisher beschriebenen Methoden weniger zeitraubend, insbesondere, weil die Sweetley-Säule ausgelassen wurde. Die Milde Alkalische Hydrolyse genügte bereits als Vorreinigung vor der Dünnschichtchro-

matographie. Die Ausbeute in unserem Verfahren war außerdem durch die Verkürzung höher als im Originalverfahren.

C. Physiko - chemische Konsequenzen

Die mögliche Rolle der Glykosphingolipide für die Hydratation des LDL- Moleküls

Grant (23) berichtet über eine Erhöhung der Hydratation des LDL- Moleküls bei Familiärer Hypercholesterinämie. Auch die von anderen Autoren beschriebene induzierbare " rouleaux"- Bildung der LDL im elektronenmikroskopischen Bild wird von diesen Autoren auf eine veränderte Hydratation der LDL zurückgeführt (50). Ein Faktor für die Erhöhung der Hydratation könnte die in dieser Arbeit nachgewiesene Erhöhung der Glykosphingolipide sein, weil dadurch auch vermehrt Polyolgruppen vorhanden sind.

Um nachzuweisen, daß beim LDL- Molekül die Glykosphingolipide peripher angelagert sind, wurde LDL von homozygoten Patienten mit Galaktosaminidase versetzt, um beim Globosid exemplarisch das terminale N-ac-Galactosamin abzuspalten. Nach Inkubation wurden die Glykosphingolipide durch Chloroform-Methanol-Extraktion und durch die Milde Alkalische Hydrolyse isoliert und durch Dünnschichtchromatographie getrennt. Dabei zeigte sich eine verstärkte Trihexosidbande,

die nach Abspaltung des N-ac-Galactosamins beim Tetrahexosid Globosid zu erwarten war.

Wenn nun die Glykosphingolipide peripher angelagert sind, dann dürften die Hydroxylgruppen am LDL-Molekül nach außen gelagert sein und der Ceramidanteil dürfte im Fett- und Phospholipidteil eingebettet liegen. Die einzelnen Hydroxylgruppen im Zuckermolekül besitzen eine polarisierte Bindung : $\text{H} - \overset{\delta+}{\text{C}} - \overset{\delta-}{\text{OH}}$. Dabei dürfte im wässrigen Milieu das acide H^+ dissoziieren und aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem Dipol Wasser und dem negativen Sauerstoff könnte es zu einer Hydratation der OH-Gruppen kommen. Ebenso kann auch die Carboxylgruppe der N-ac-neuraminsäure im Hämosid vermehrt hydratisiert sein. Welche anderen molekularen Veränderungen im LDL-Molekül eine Veränderung der Hydratation als weiterer Grund bewirken können, z.B. Veränderungen im Apoproteinanteil, läßt sich zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht sagen. Was allerdings noch zu der Arbeit von Grant zu erwähnen ist, ist die Tatsache, daß bei seinen Untersuchungen die Hydratation der heterozygoten LDL etwa in der Mitte zwischen homozygoten und normalen Werten lag; auch die Konzentrationen der Glykosphingolipide/ Apoprotein lag bei heterozygoten Patienten etwas unterhalb das Mitte zwischen Normalpersonen und homozygoten Patienten.

D. Biologische Schlußfolgerungen

1.) Mögliche Auswirkungen einer Veränderung der Glykosphingolipid-Konzentration im LDL-Molekül für den Metabolismus dieses Moleküls

Obwohl bei der Erforschung der Pathogenese der Familiären Hypercholesterinämie in den letzten Jahren Fortschritte erzielt wurden, bleiben noch einige Fragen offen. Der bei dieser Stoffwechselkrankheit typische Anstieg der LDL kann zwei Gründe haben: Einmal eine übersteigerte Synthese der Lipoproteine, andererseits einen gestörten Katabolismus.

Verschiedene Autoren haben sich bereits mit dem Metabolismus und dem Katabolismus der LDL beschäftigt. Dabei wurde der Stoffwechsel des Moleküls gemessen und verfolgt, nachdem es radiomarkiert worden war. Dabei fanden Langer et al. (32), daß die FCR (= fractional catabolic rate = die Fraktion des intravaskulären LDL- pools, die pro Tag abgebaut wird) bei Patienten mit heterozygoter Familiärer Hypercholesterinämie so stark erniedrigt war, daß allein diese Abbaustörung den Anstieg der LDL- Konzentration im Serum dieser Patienten erklären könnte. Die dabei untersuchte Syntheserate der LDL zeigte keine signifikante Differenz zu Normalpersonen. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch Packard (36), nur konnte er auch eine Erhöhung der LDL- Synthese bei der Familiären

Hypercholesterinämie feststellen und folgerte, daß sowohl Syntheseerhöhung der LDL und auch eine gleichzeitiger Defekt im Katabolismus dieses Moleküls den Anstieg der LDL bewirken. Andere Autoren konnten sowohl eine erniedrigte FCR (46) feststellen, als auch eine erhöhte LDL- Syntheserate beweisen (41). Somit ist wahrscheinlich, daß beide Faktoren eine Rolle für die Erhöhung der LDL- Konzentration spielen.

Die Möglichkeit, daß auch eine Veränderung der Quantität der Glykosphingolipide im LDL- Molekül einen Einfluß auf den Stoffwechsel, speziell auf den Katabolismus des LDL- Moleküls, ausüben könnte, läßt sich vor allem aus folgenden Erkenntnissen über die biologischen Funktionen der Glykosphingolipiden ableiten.

Die Glykosphingolipide spielen eine bedeutende Rolle als Vermittler interzellulärer Verhaltensweisen (44, 30, 26), was bereits ihr Vorhandensein auf Zelloberflächen als integraler Bestandteil der Plasmamembranlipide erkennen läßt, und ferner aus der Rolle der Glykosphingolipide als antigenspezifische Determinanten bei immunologischen Reaktionen (z.B. Erythrozytenoberfläche) ersichtlich ist. Weiterhin ist bei einer veränderten Zusammensetzung der oberflächlichen Glykosphingolipide - qualitativ und quantitativ - bei malignen Zellen das soziologische Verhalten der Zel-

len stark verändert, was bedeutet, daß die Glykosphingolipide vor allem auch eine Funktion bei der zellulären Erkennung und Haftung zu erfüllen scheinen (30).

Vor allem die N-ac-neuraminsäure hat außer Galactosamin und Glucosamin eine große Bedeutung für die Erkennung von Zellen und auch für den Katabolismus einzelner Moleküle: Jancik et al.(29) behandelten menschliche Erythrozyten mit Neuraminidase, was zur Abspaltung von N-ac-neuraminsäure führte, die an der Erythrozytenoberflächenmembran gebunden vorliegt. Dabei wurde festgestellt, daß die Überlebenszeit dieser Erythrozyten stark herabgesetzt war, und dieser verstärkte Abbau war nicht durch eine physikalisch-chemische Änderung der Erythrozytenstabilität bedingt, sondern durch eine beschleunigte Elimination nach Veränderung der N-ac-neuraminsäurekonzentration an der Oberfläche der Erythrozyten. Eine weitere Arbeit berichtet über gleiche Ergebnisse bezüglich der Überlebenszeit der Erythrozyten nach Neuraminidasebehandlung und dabei wurde auch bei verschiedenen Plasmaglykoproteinen eine partielle oder sogar totale Elimination aus dem Blutkreislauf von Ratten festgestellt, nachdem Neuraminidase injiziert worden war (24). Morell et al (2) konnten ebenfalls eine verringerte Überlebenszeit von Glykoproteinen im Blut nachweisen, nachdem die oberflächlichen N-ac-neuraminsäuren abgespalten waren . Die N-ac-neuraminsäure hat bei dem Abbau

der Glykoproteine zwei verschiedene Funktionen zu erfüllen: Die N-ac-neuraminsäure - Reste auf den Rezeptoren der Leberzellmembranen müssen intakt sein, um eine Bindung mit den abzubauenen Glykoproteinen herbeiführen zu können. Andererseits müssen die terminalen N-ac-neuraminsäuremoleküle an der Glykoproteinoberfläche langsam abgespalten werden, um den danach zum Vorschein kommenden terminalen Galactosegruppen, die als Hauptdeterminanten für die hepatische Erkennung anzusehen sind, die Möglichkeit einer Bindung an die spezifischen Rezeptoren der Leberzellen zu geben. Der Ort der enzymatischen Aktivität, der für die langsame Abgabe der N-ac-neuraminsäure der Glykoproteine verantwortlich ist, muß noch genau bestimmt werden. Sollte diese Funktion der N-ac-neuraminsäure außer bei den bereits untersuchten Glykoproteinen auch für Glykosphingolipide zutreffen. ergäbe sich nach unseren Ergebnissen folgende Perspektive: Als das Glykosphingolipid, das terminal ein N-ac-neuraminsäurebestandteil besitzt, das an Galactose gebunden vorliegt, käme bei den in dieser Arbeit untersuchten Glykosphingolipiden nur das Hämatosid in Frage (Cer - Glu-Gal- N-ac-neuraminsäure) . Wie aus Tabelle IV zu entnehmen ist, ist bei homozygoten Patienten der Hämatosidgehalt gegenüber Normalpersonen um 141 % erhöht, bei heterozygoten Patienten um 53 %. Wenn nun angenom-

men wird, daß zwischen dem Gehalt der LDL an Hämato-
sid (und entsprechend dem Gehalt an N-ac-neuraminsäu-
re) und der Abbaugeschwindigkeit der LDL wie bei den
Glykoproteinen eine umgekehrt proportionale Beziehung
besteht, so kann ein Faktor für die Erhöhung der LDL-
Konzentration bei der Familiären Hypercholesterinämie
darin bestehen, daß die LDL- Moleküle deshalb lang-
samer abgebaut werden, weil der normale Mechanismus
einer langsamen Abgabe von N-ac-neuraminsäure (wie
Morell annimmt) und der dann erst mögliche Katabolis-
mus der desialierten LDL durch eine Erhöhung der Kon-
zentration von N-ac-neuraminsäure/Lipoproteinmolekül
verlangsamt wird.

Um die Richtigkeit dieser Hypothese zu über-
prüfen, wäre der nächste Schritt eine Prüfung der Ü-
berlebensrate von radioaktiv markierten LDL, die mit
Neuraminidase behandelt worden sind, bei Patienten
mit Familiärer Hypercholesterinämie und bei Normalper-
sonen. Sollte dabei eine Störung der Abbaugeschwindig-
keit durch eine erhöhte Konzentration von N-ac-neura-
minsäure verifiziert werden können, müßte versucht
werden, ob sich mit Hilfe von Neuraminidase eventuell
klinisch - therapeutische Konsequenzen ergeben könn-
ten.

2.) Mögliche Änderungen des Stoffwechsels der LDL im peripheren Gewebe

Der Abbau der LDL geschieht auch im peripheren Gewebe. Wesentliche Erkenntnisse über das Verhalten von Hautfibroblasten - als peripheres Gewebe - bei der Familiären Hypercholesterinämie verdanken wir den Arbeiten von Goldstein und Brown. Sie stellten exakte Kriterien auf, welche die Diagnose einer Familiären Hypercholesterinämie durch das Verhalten von Fibroblasten zweifelsfrei erlauben:

- a.) Die Aufnahme von LDL in die Fibroblasten muß verringert sein
- b.) Der Cholesterinestergehalt der Fibroblasten muß erniedrigt sein
- c.) Die Cholesterinsynthese muß erhöht sein, da die HMG - CoA- Reduktase - Aktivität bei der Familiären Hypercholesterinämie nicht durch LDL gehemmt wird
- d.) Die erhöhte Syntheserate des Cholesterins in den Fibroblasten ist bei der Familiären Hypercholesterinämie nicht durch die LDL hemmbar (21,22, 9).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten homozygoten Patienten waren diese Kriterien erfüllt, da in anderen Versuchen das Verhalten deren Hautfibroblasten bezüg-

lich der oben genannten Kriterien untersucht worden war.

Goldstein und Brown führen den verminderten Abbau von LDL bei der Familiären Hypercholesterinämie im peripheren Gewebe auf ein Fehlen der Bindung von LDL an sehr spezifische Rezeptoren auf der Zellmembran der Fibroblasten zurück (21). Dabei ergeben sich folgende Möglichkeiten: Entweder liegt der Defekt am Rezeptor (Fehlen des Rezeptors oder fehlerhafte Zusammensetzung der spezifischen Rezeptormoleküle) selbst, oder aber die Bindung des LDL- Moleküls an den Rezeptor ist dadurch gestört, daß durch die Veränderung der Konzentration der Glykosphingolipide, die, wie erwähnt, vielfach die Aufgabe des Erkennens bei intrazellulären Interaktionen übernehmen, die Erkennung des LDL- Moleküls durch den spezifischen Rezeptor unmöglich ist und somit keine Bindung an der Fibroblastenmembran zustande kommen kann.

Die Möglichkeit, daß durch eine erhöhte Oberflächenkonzentration der Glykosphingolipide im LDL- Molekül das Bindungsverhalten der LDL gestört sein könnte, wird bestärkt durch eine Arbeit, die berichtet, daß Globosid in der Lage ist, Phospholipid-bilayer- Strukturen zu verändern (47) . Dies ist sowohl beim LDL- Molekül möglich, weil durch die nachgewiesene Erhöhung des Globosidgehaltes der LDL bei der Familiären Hypercholesterinämie die Oberflächen-

morphologie des LDL- Moleküls verändert sein könnte, was die Bindung an die LDL-spezifischen Rezeptoren der Fibroblasten beeinflussen könnte. Andererseits könnte aber auch die Zellmembranstruktur der Fibroblasten gestört sein, da festgestellt wurde (12), daß die Zelloberfläche von Fibroblasten bei der Familiären Hypercholesterinämie einen gegenüber Normalpersonen vierfach erhöhten Globosidgehalt aufwiesen.

Aus den erwähnten Aspekten läßt sich ableiten, daß bei der Familiären Hypercholesterinämie die Erhöhung der LDL- Konzentration im Serum vermutlich durch mehrere Veränderungen sowohl des LDL-Moleküls, als auch durch Unterschiede an Fibroblasten bewirkt wird.

Die möglichen beschriebenen Auswirkungen der erhöhten Glykosphingolipidkonzentration im LDL- Molekül und auch der Effekt einer erhöhten Hydratation sind bisher noch ungenügend erforscht, so daß der endgültige Pathomechanismus, bzw. die zugrunde liegenden genetischen Abweichungen noch sehr unklar sind, und auch die erwähnten Hypothesen über Abbaustörungen der LDL bei der Familiären Hypercholesterinämie, die sich aus einer Erhöhung der Konzentration der Glykosphingolipide im LDL- Molekül ergeben könnten, sind eher als Denkanstöße zu einer weiteren Forschung in dieser Richtung zu verstehen.

A_B_K_Ü_R_Z_U_N_G_E_N

VLDL = very low density lipoprotein

LDL = low density lipoprotein

HDL = high density lipoprotein

GSL = Glykosphingolipide

Cer = Ceramid

Glu = Glucose

Gal = Galactose

N-ac-Gal = N-Acetyl- Galactosamin

Glu - cer = Glucosyl - β -(1-1)-ceramid

Lac - cer = Galactosyl- β -(1-4)-glucosylceramid

Trihexosid = Galactosyl - α -(1-4)-galactosyl- β -(1-4)-
glucosylceramid

Globosid = N-ac-galactosaminyl- β -(1-3)-galactosyl- α -
(1-4)-galactosyl- β -(1-4)-glucosylceramid

Hämatosid = N-ac-neuraminyl- α -(2-3)-galactosyl- β -(1-4)
-glucosylceramid

NANA = N-acetyl-neuraminsäure

HMG-Co- A : β -hydroxyl- β -methyl-glutaryl- Coenzym A

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Glykosphingolipidgehalte der low density lipoproteins von Normalpersonen, von 6 heterozygoten Patienten und von 3 homozygoten Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie wurden mit Hilfe der Gaschromatographie quantifiziert. Dabei konnte festgestellt werden, daß Glucosylceramid, Trihexosid, Globosid und auch Hämatosid bei den LDL der Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie signifikant höher waren als bei den Kontrollpersonen, wobei der Anstieg der Glykosphingolipide bei den homozygoten Patienten fast doppelt so hoch ausfiel, wie bei den heterozygoten Patienten. Bei den VLDL und HDL war der Anstieg des Hämatosides nicht signifikant. Diese Erhöhung des Glykosphingolipidgehaltes ist scheinbar typisch für die Familiäre Hypercholesterinämie und kann nicht einer zufälligen Variante dieser Erkrankung zugeschrieben werden. Es wurde diskutiert, ob diese Veränderungen der Glykosphingolipidgehalte der LDL Auswirkungen auf den Stoffwechsel oder den Abbau der LDL haben könnten, wobei vor allem die Erhöhung des Hämatosides in dieser Beziehung eine Rolle spielen könnte.

VII. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S
=====

1. AMINOFF, D.,
Methods for the quantitative estimation of N-ace-
tyl-neuraminic acid and their application to hydro-
lysates of sialmucids
The biochemical journal, Nr. 81, S.: 384-392 (1961)
2. ASWELL, G., MORELL, A.,
The role of surface carbohydrates in the hepatic
recognition and transport of circulating glykopro-
teins
Advances in enzymology, S.: 99 - 129 (1973)
3. AURAN, T., ZAVORAL, J., KRIVIT, W.,
Elevated levels of sphingolipids in type II (a+b)
hyperlipoproteinemia
Thromb. Research, Nr. 5, S.: 173 - 184 (1974)
4. BAGNALL, T.F.,
Composition of Low Density Lipoproteins in chil-
dren with familial hyperbetalipoproteinemia and
the effect of treatment
Clinical Chemical Acta, 42, S.: 229 - 233 (1972)
5. BARTLETT, G.R.
Phosphorus assay in column chromatography
The journal of biological chemistry, Nr. 234
S.: 466 - 471 (1959)

6. BASU, S., KAUFMAN, B., ROSEMAN, S.,
Enzymatic synthesis of ceramid - glucose and ceramid - lactose by glycosyltransferases from embryonic chicken brain
The journal of biological chemistry, Nr. 243,
S.: 5802 - 5804 (1968)
7. BRADY, R., FISHMAN, P.,
Biosynthesis of glycolipids in virus-transformed cells
Biochemica and biophysica Acta , Nr. 355 ,S.:121-148
(1974)
8. Braun - Falco, O., KELLER, C., ZÖLLNER, N.,
Xanthoma formation and other tissue reactions to hyperlipidemias
Karger, Basel (1973)
9. BROWN, M., FAUST, J., GOLDSTEIN, J.,
Role of the low density lipoprotein receptor in regulating the content of free and esterified cholesterol in human fibroblasts
The journal of clinical investigation, Nr. 55
S.: 783 - 793 (1975)
10. CARTER, H., JOHNSON, P., WEBER, E.,
Glycolipids
Annual review of biochemistry, Nr. 34, S.: 109-140
(1965)

11. CHATTERJEE, S., KWITEROVICH, P.O.,
Glycosphingolipids of human plasma lipoproteins
Lipids, Nr. 11, S.: 462 - 466 (1976)
12. CHATTERJEE, S., SEKERKE, C., KWITEROVICH, P.,
Alterations in cell surface glycosphingolipids and
other lipid classes of fibroblasts in familial
hypercholesterolemia
Proceeding of the national academy of science, USA
Nr. 73, S.: 4339 - 4343 (1976)
13. CLARKE, J., STOLTZ, J.,
Uptake of radiolabeled galactosyl-galactosyl-glu-
cosyl ceramide by human serum lipoproteins in vitro
Biochemica and biophysica acta, Nr. 441, S.: 165-169
(1976)
14. COLES, E., FOOTE, L.,
Glycosphingolipids from rabbit aorta, plasma, and
blood cells: Effects of high cholesterol-high fat
diets on fatty acid distribution and quantity of
glycosphingolipids
Journal of lipid research, Nr. 15, S: 192-199, (1974)
15. DAWSON, G., KRUSKI, A., SCANU, A.,
Distribution of glycosphingolipids in the serum
lipoproteins of normal human subjects and patients
with hypo- and hyperlipidemia
Jour. of lipid research, Nr. 17, S.: 125-131, (1976)
16. DAWSON, G., SWEETLEY, C.,
In vivo studies on glycosphingolipid metabolism
in porcine blood

journal of biological chemistry, Vol 245,
S.: 410 - 416, (1970)

17. ETCHINSON, M., HOLLAND, J.,
A procedure for the rapid quantitative N-acetylation of amino sugar methyl glycosides
Analytical biochemistry, Nr. 66, S:87-92, (1975)
18. FREDRICKSON, D., LEVY, R. in
The metabolic basis of inherited disease
S: 545 - 614 (1972)
19. GACTO, M., STEINER, S.,
Fucolipid metabolism as a function of cell-population density in normal and murine sarcoma virus-transformed rat cells
Biochemica and biophysica acta, Nr. 444, S.:11-22
(1976)
20. GOLDSTEIN, J., ALBERS, J.,
Plasma lipid levels and coronary heart disease in adult relatives of newborns with normal and elevated cord blood lipids
American journal of human genetics, Nr. 26
S.: 727 - 735 (1974)
21. GOLDSTEIN, J., BROWN, M.,
Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts
Journal of biological chemistry, Vol. 249
S.: 5153 - 5162 (1974)
22. GOLDSTEIN, J., BROWN, M.,
Familial hypercholesterolemia: Identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol

Proceeding of the national academy of science
Nr. 70, S.: 2804 - 2808 , (1973)

23. GRANT, E., SHEPPARD, R., MILLS, G., SLICK, J.,
A dielectric investigation of the water of hydration of low density lipoproteins in familial hyperbetalipoproteinemia
Lancet, 1, S: 1159 - 1161, (1972)
24. GREGORIADIS, G., PUTMAN, D., LOUIS, L.,
Comparative effect and fate of non-entrapped and liposome entrapped neuraminidase injected into rats
Biochemical journal, Nr. 140, S: 323 - 330 (1974)
25. GRETEN, H., WENGLER, H., WAGNER, H.,
Early diagnosis of familial type II in Xanthoma formation and other tissue reactions to hyperlipidemias
Karger, Basel (1973)
26. HAKOMORI, S.
Structures and organisation of cell surface glycolipids dependency on cell growth and malignant transformation
Biochemica and biophysica acta, Nr. 417,
S.: 55 - 89, (1975)
27. HAVEL, R., EDER, H., BRAGDON, J.,
The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum
Journal of clinical investigation, Nr. 34
S.: 1345 - 1353, (1955)
28. HOFF, H.F., LIE, J.,
lipoproteins in atherosclerotic lesions

29. JANCÍK, J., SCHAUER, R., STREICHER, H.,
Influence of membrane-bound N-acetylneuraminic
acid on the survival of erythrocytes in man
Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie
Nr. 356, S.: 1329 - 1331, (1975)

30. KEENAN, T., SCHMID, E., FRANKE, W., WIEGANDT, H.,
Exogenous glycosphingolipid suppress growth rate of
transformed and untransformed 3T3 mouse cells
Experimental cell research, Nr. 92, S: 259-270 (1975)

31. KWITEROVICH, P., LEVY, R., FREDRICKSON, D.,
Neonatal diagnosis of familial type-II-hyperlipo-
proteinemia
Lancet, 1, S.: 118 - 121, (1973)

32. LANGER, T., STROBER, W., LEVY, R.,
The metabolism of low density lipoprotein in fa-
miliar type II hyperlipoproteinemia
Journal of clinical investigation, Nr. 51,
S.: 1528 - 1536 , (1972)

33. LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FARR, A., RANDALL, L.,
Protein measurement with the folin phenol reagent
Journal of biological chemistry, Nr. 193,
S.: 265 - 275 , (1951)

34. MATALON, R., DORFMAN, A.,
Acid mucopolysaccharides in cultured human fibro-
blasts
The lancet 1, S.: 838 - 841, (1969)

35. MILLS, G., TAYLOR, C., CHAPMAN, M.,
low density lipoproteins in patients homozygous for

familial hypercholesterolemia

Clinical science and molecular medicina, Nr. 51
S.: 221 - 231 , (1976)

36. PACKARD, C., THIRD, J., SHEPHERD, J., LORIMER, A., MORGAN
Low density lipoprotein metabolism in a family
of familial hypercholesterolemic patients
Metabolism, Vol. 25, Nr. 9, S.: 995-1006, (1976)
37. REDGRAVE, T., ROBERTS, D., WEST, C.,
Separation of plasma lipoproteins by density-gra-
dient ultracentrifugation
Analytical biochemistry, Nr. 65, S:42-49, (1975)
38. RICHARDSON, C., BAKER, S., MORRE, J., KEENAN, W.,
Glycosphingolipid synthesis and tumorigenesis:
a role for the Golgi-Apparatus in the origin
of specific receptor molecules of the mammalian
cell surface
Biochemica and biophysica acta, Nr. 417,
S.: 175 -186, (1975)
39. ROE, J.,
The determination of sugar in blood and spinal
fluid with Anthrone Reagent
Journal of biological, S. 335 - 343 (1970)
40. SCHLIERF, G., KAHLKE, W.
Fettstoffwechsel, in "Klinische Pathophysiologie"
Thieme Verlag, 1973, S.: 128 - 168
41. SIMONS, L., REICHL, D., MYANT, N.,
The metabolism of the apoprotein of plasma low
density lipoprotein in familial hyperbetalipopro-
teinemia in a homozygous form
Atherosclerosis, 21, S.: 283 - 298, (1975)

42. SLACK,JOAN,MILLS,
Anomalous low density lipoproteins in familial
hyperbetalipoproteinemia
Clinical chimica acta, Nr. 42, S:229-233, (1970)
43. SMITH,E.,McKIBBIN,J.,KARLSSON,K.,
Characterization by mass spectrometry of blood
group A active glycolipids from human and dog small
intestine
Biochemistry,Vol. 14, Nr.10, S:2120-2124,(1975)
44. STOFFEL,W.,
Sphingolipids
Annual review of biochemistry, Vol.40,S:57-82(1971)
45. TAO,R.,SWEeley,C.
Occurence of hematoside in human plasma
Biochimica and biophysica acta, Nr. 218,
S.: 372 - 375 (1970)
46. THOMPSON,G.,MYANT,N.,
Low density lipoprotein turnover in familial hyper
cholesterolemia after plasma exchange
Atherosclerosis, Nr.23, S: 371-377, (1976)
47. Tincer,D.,PINTERIC,L.,HSIA,J.,
Perturbation of lecithin bilayer structure by globoside
Canadian journal of biochemistry, Nr. 54
S.: 209 - 218, (1976)
48. UNDEUTSCH,D.,GRIES,F.,KLEMENS,U.,VOGELBERG,K.,
Fettstoffwechselstörungen
S.: 186 - 192, 1972, Schattauer Verlag
49. VANCE,D.,SWEeley,C.,
Quantitative determination of the neutral glyco-

syl ceramides in human blood
Journal of lipid research, Nr. 8, S: 621 - 630
(1967)

50. WALTHER,B.,

The effect of preparation on the rouleaux-formation of LDL particles of the familial hypercholesterolemia: Electron microscopic studies
(in press)

51. ZLATAKIS,A.,ZAK,B.,BOYLE,A.,

A new method for the direct determination of serum cholesterol
Journal of laboratory and clinical medicine,
Nr. 41, S.: 486 - 492, (1957).

L E B E N S L A U F

Am 22.12. 1951 wurde ich als Sohn des Verwaltungsrates Andres Sailer und seiner Ehefrau Johanna Sailer, geb. Klaus, in Günzburg/ Donau geboren.

Von 1958 - 1962 besuchte ich die Volksschule in Günzburg, 1962 wechselte ich auf den humanistischen Zweig des Dossenberger - Gymnasiums über. Nach meinem Abitur 1971 leistete ich meinen Wehrersatzdienst als Pfleger in der Urologischen Klinik, Augsburg ab.

Im Sommersemester 1973 begann ich in München an der Ludwig- Maximilian- Universität das Studium der Medizin. Im März 1975 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, im Sommer 1975 heiratete ich die Erzieherin Jutta Kern. Im Mai 1976 begann ich mit den Experimenten für meine Dissertation, die ich im Oktober 1977 abschliessen konnte. Mein Studium schloß ich am 30. Mai 1979 mit dem bestandenen 3. Staatsexamen ab, am 11. Juni erhielt ich meine Approbation als Arzt .

Die Gehalte der Low-Density- Lipoproteine an Glykosphingolipiden wurden bei 6 Normalpersonen, bei 6 Patienten mit heterozygoter Familiärer Hypercholesterinämie und bei 3 homozygoten Patienten mit Hilfe der Gaschromatographie gemessen und verglichen. Dabei wurde festgestellt, daß die vier neutralen Glykosphingolipide bei heterozygoten und bei homozygoten Patienten erhöht waren, wobei diese Erhöhung pro Apoproteinanteil bei homozygoten Patienten deutlich größer war als bei heterozygoten Patienten. Dabei waren die Werte bei Glycosylceramid, bei Trihexosid und bei Globosid bei homozygoten Patienten alle über zweifach gegenüber Normalpersonen erhöht, während bei Lactosylceramid kein deutlicher Unterschied zu verzeichnen war. Hämatosid war nur in der LDL-Fraktion bei hetero- und homozygoten Patienten erhöht, bei den VLDL und den HDL war kein Unterschied bezüglich des Hämatosidgehaltes bei Normalpersonen und bei Patienten mit FHC festzustellen. Ferner wurde durch photometrische Messungen bestätigt, daß der Anteil von Cholesterin im LDL-Molekül bei der FHC erhöht ist, das Verhältnis von Cholesterin/Apoprotein ist vergrößert. Es wurde diskutiert, ob die Erhöhung der GSL/Apoprotein LDL zu Veränderungen der Hydratation des Moleküls führen könnten, die festgestellt worden sind. Ferner wurde untersucht, inwieweit der Abbau der LDL durch die erhöhten GSL, insbesondere durch Hämatosid, beeinflußt werden konnte. Insgesamt kann angenommen werden, daß die festgestellten erhöhten Konzentrationen des LDL-Moleküles an GSL nicht eine spezielle Variante der Familiären Hypercholesterinämie kennzeichnen, sondern daß sie ein spezifisches Kennzeichen der Krankheit sein dürften.

